

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 2001-278896

(43)Date of publication of application : 10.10.2001

(51)Int.Cl.

C07K 14/08
A61K 39/12
A61P 31/12
// A01K 61/00
C12N 1/21
C12N 15/09
C12P 21/02

(21)Application number : 2000-086963

(22)Date of filing : 27.03.2000

(71)Applicant : FISHERIES AGENCY

(72)Inventor : MORI KOICHIRO
NAKAI TOSHIHIRO

(54) RECOMBINANT COAT PROTEIN OF NERVOUS NECROSIS-CAUSING VIRUS INFECTING GROUPERS

(57)Abstract:

PROBLEM TO BE SOLVED: To provide the recombinant coat proteins of nervous necrosis-causing viruses infecting groupers, and to provide a vaccine using the same, because the prevention of the viral disease by the use of the vaccine is an ideal viral disease measure by which the maximum effect can be expected at the minimum cost.

SOLUTION: The recombinant coat protein of a RG type virus among four different gene type viral nervous necrosis-causing viruses having pathogenicity against fishes was obtained. The protein is useful as a vaccine for preventing the infection of the RG type virus infecting the groupers.

LEGAL STATUS

[Date of request for examination]

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number]

[Date of registration]

[Number of appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of requesting appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of extinction of right]

THIS PAGE BLANK (USPTO)

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開2001-278896

(P2001-278896A)

(43) 公開日 平成13年10月10日 (2001. 10. 10)

(51) Int.Cl. ⁷	識別記号	F I	テ-マ-ト* (参考)
C 0 7 K 14/08		C 0 7 K 14/08	2 B 1 0 4
A 6 1 K 39/12		A 6 1 K 39/12	4 B 0 2 4
A 6 1 P 31/12		A 6 1 P 31/12	4 B 0 6 4
// A 0 1 K 61/00		A 0 1 K 61/00	B 4 B 0 6 5
C 1 2 N 1/21		C 1 2 N 1/21	4 C 0 8 5
審査請求 未請求 請求項の数 3 O L (全 10 頁) 最終頁に続く			

(21) 出願番号 特願2000-86963(P2000-86963)

(22) 出願日 平成12年3月27日 (2000. 3. 27)

(71) 出願人 591257937

水産庁長官

東京都千代田区霞ヶ関1-2-1

(72) 発明者 森 広一郎

大分県佐伯市来島町3-14

(72) 発明者 中井 敏博

広島県東広島市西条町下三永354-107

(74) 代理人 100068700

弁理士 有賀 三幸 (外4名)

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 ハタ類のウイルス性神経壊死症原因ウイルスの組換え外被タンパク質

(57) 【要約】

【解決手段】 ハタ類のウイルス性神経壊死症原因ウイルスの組換え外被タンパク質およびこれを含むワクチン。

【効果】 本発明によれば、魚類に病原性を有するウイルス性神経壊死症原因ウイルスの4つの異なる遺伝子型のウイルスうち、RGタイプについての組換え外被タンパク質が得られた。さらに、本タンパク質はハタ類に感染するRGタイプのウイルスに対する感染防止用ワクチンとして有用である。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 ハタ類のウイルス性神経壊死症原因ウイルスの組換え外被タンパク質。

【請求項2】 配列番号2記載のアミノ酸配列、又は該アミノ酸配列に対して1個若しくは複数個のアミノ酸配列が置換、欠失又は付加されているアミノ酸配列を有するものである請求項1記載の組換え外被タンパク質。

【請求項3】 請求項1又は2記載の組換え外被タンパク質を含むハタ類のウイルス性神経壊死症用ワクチン。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は、ハタ類のウイルス性神経壊死症の原因ウイルスの組換え外被タンパク質及びこれを用いるワクチンに関する。

【0002】

【従来の技術】現在我が国では、放流による資源の維持あるいは回復を目的とした栽培漁業、あるいは水産物の計画的かつ安定した生産供給が可能である養殖業などの「つくり育てる漁業」の振興に力が注がれているが、病害問題も深刻化しつつある。海産魚のウイルス性神経壊死症(Viral nervous necrosis: VNN)は、イシダイで最初に報告され、その後キジハタやシマアジなどでも発生が確認され、多くの海産魚に大きな被害をもたらす疾病となっている。また諸外国においてもVNNに類似した疾病(encephalomyelitis, encephalopathyあるいはencephalitisなど)がオーストラリア、タヒチやインドネシア、フィリピン、マレーシアおよびシンガポールといった東南アジア各国のバラマンディー、ノルウェーのターボット、ハリバット、フランスのスズキ、シンガポールのヒトミハタ、およびタイのチャイロマルハタで報告されている。本病は、主として仔稚魚期に発生し、外見的には殆ど症状は認められないが、病魚は旋回、回転、横転、転覆等の遊泳異常を示す。また組織学的には、中枢神経系および網膜の神経細胞の壊死崩壊に伴う大型の空胞形成を特徴としている。原因ウイルスは小型のssRNAウイルスで、ノダウイルス科に分類されている。

【0003】この数種海産魚で報告されているVNNの感染経路については不明な点が多く、適切な防除方法が確立されていない。ただし、孵化直後に本病が発生するシマアジについては、親魚生殖腺から高率にウイルスが検出されることから、親魚からの垂直感染が主要な感染経路であることが明らかにされており、親魚生殖腺におけるウイルスの有無をポリメラーゼ連鎖反応(Polymerase chain reaction: PCR)によって調べ、陰性親魚だけを産卵に用いることによりVNNの発生率を低下させることに成功している。このようにシマアジのVNNにおいては、垂直感染が主要な感染経路であり、ウイルスフリーの親魚から種苗を得る対策が有効と考えられる。

【0004】しかし他魚種においては、稚魚や成魚にお

いても感染死亡があり、親魚からの垂直感染を遮断する対策のみでは不十分と考えられる。特にハタ類では、海面生け簀での育成課程で本病が発生していることから、育成環境に混入したウイルスによる水平感染を遮断する対策も必要不可欠と考えられる。またハタ類のVNN防除については、ハタ類の魚価が高いこと、我が国のみならず東南アジアでの被害も多発していることから、産業的要望は非常に大きい。以上のような背景から、ハタ類VNNの水平感染を遮断する対策の開発が望まれていた。

10 【0005】ところで、VNNの原因ウイルスには4つの異なる遺伝子型が存在する。すなわち、シマアジに感染するSJタイプ(SJNNV)、トラフグに感染するTPタイプ(TPNNV)、マツカワに感染するBFタイプ(BFNNV)およびハタ類に感染するRGタイプ(RGNNV)が存在する。

【0006】

【発明が解決しようとする課題】ウイルス病のワクチンによる予防は、最小の費用で最大の効果が期待される理想的なウイルス病対策である。ワクチンには、不活化ワクチン、弱毒生ワクチンおよび成分ワクチンなどがあるが、本疾病への応用を考えると安全性および大量調整が可能であることから、遺伝子組換えによる成分ワクチンの開発が適している。従って本発明は、ハタ類のVNNの原因ウイルスであるウイルスの組換え外被タンパク質及びこれを用いたワクチンを提供することを目的とする。

【0007】

【課題を解決するための手段】そこで本発明者らは、RGタイプのウイルスの遺伝子配列を解析し、クローニングしたウイルス外被タンパク質遺伝子を用いて大腸菌で組換え外被タンパク質を発現させ、更に得られたタンパク質がワクチンとして有用であることを確認し、本発明を完成するに至った。すなわち、本発明は、ハタ類のVNN原因ウイルスの組換え外被タンパク質を提供するものである。また、本発明は、当該組換え外被タンパク質を含むハタ類のVNN用ワクチンを提供するものである。

【0008】

【発明の実施の形態】本発明の組換え外被タンパク質は、ハタ類のVNN原因ウイルス、すなわち、RGタイプの神経壊死症ウイルス(RGNNV)がハタ類の細胞内で産生する外被タンパク質である。ここで、ハタ類には、キジハタ、マハタ、クエ等が含まれる。

【0009】本発明の組換え外被タンパク質は、例えば次の如くして作製できる。

40 【0010】まず、RGタイプの基準種であるキジハタ由来株のウイルス外被タンパク質遺伝子を決定する。その結果、明らかになったウイルスの外被タンパク質遺伝子リーディングフレームの両側に存在する配列を利用し、RGタイプのウイルス外被タンパク質遺伝子がクローニング可能なプライマーを設計する。ここで外被タンパク質遺伝子の決定は、抽出したウイルスRNAにポリ(A)を付加した後、クローニングベクターを調製し、次いでcDNAを

合成し、得られたcDNAクローンから組換えcDNAクローンをスクリーニングした後、得られたクローンの塩基配列を決定すればよい。判明した塩基配列からPCR用プライマーを常法に従い設定する。

【0011】次いで、得られたPCR用プライマーを用いて遺伝子の増幅を行い、全長の外被タンパク質遺伝子cDNAのクローニングを行う。具体的には、作製したプライマーを用いPCRで増幅しcDNAの合成を行った後、発現用プラスミドベクター、例えばpET-16b(Novagen)で組換え体を作製し、タンパク質発現用の宿主細胞、例えば大腸菌BL21(DE3)細胞に導入して行えばよい。なお、実際には、得られた組換え体(例えば大腸菌)について電気泳動解析およびウエスタンブロット解析を行い、用いたすべての株で、ウイルス外被タンパク質と同じ分子量のタンパク質の発現を確認した。また、これらの組換えタンパク質は、前述のシマアジに感染するSJタイプのウイルスに対する抗体である抗SJNNVウサギ抗体と反応したことから発現したウイルス外被タンパク質であることが確認された。

【0012】免疫抗原の調製のために、作製した組換え体(例えば大腸菌)を大量培養し、発現誘導をおこなった後、菌体を超音波処理により完全に破壊する。発現した組み換え外被タンパク質は大腸菌中で高度凝集物である封入体として不溶性画分に現れたことから、界面活性剤中で遠心洗浄することで、容易に純度の高い組み換え外被タンパク質の精製品を得ることができる。後述の実施例では、大腸菌培養液1mlから約5mgの組換え外被タンパク質を得ることができた。

【0013】かくして得られる本発明の組換え外被タンパク質としては、配列番号2記載のアミノ酸配列、又は該アミノ酸配列に対して1個若しくは複数個のアミノ酸が置換、欠失又は付加されているアミノ酸配列を有するものが挙げられる。かかる置換、欠失又は付加の程度は、配列番号2記載のアミノ酸配列を有するタンパク質と同様のワクチン活性を有する範囲であれば特に制限されない。

【0014】本発明の組換え外被タンパク質を接種したハタ類は、その後RGNNVによるウイルス攻撃を行っても非接種群に比べて有意に死亡率が低下することから、本発明の組換え外被タンパク質はRGNNVに対するワクチンとして有用である。

【0015】本発明組換え外被タンパク質をワクチンとして投与できる対象魚としては、ハタ類であれば特に限定されず、キジハタ、マハタ、クエ等が挙げられる。また本発明ワクチンの投与形態は、注射剤が好ましく、その形態は液剤でも、また用時溶解して投与する粉体状製剤でもよい。これらの製剤を製造するに際しては、本発明組換え外被タンパク質以外に、注射用蒸留水、安定化剤、界面活性剤などを適宜添加することができる。

【0016】本発明ワクチンの投与量は、特に制限され

ないが、本発明組換え外被タンパク質として1 μ g~1mg/尾が好ましい。また投与回数は2回~5回が好ましい。

【0017】

【実施例】次に実施例を挙げて本発明を詳細に説明するが、本発明はこれらに限定されるものではない。

【0018】実施例1

1. 外被タンパク質遺伝子クローニング用のPCRプライマーの設計

1) ウイルス核酸の調製

ウイルス株は、RGタイプのウイルスとして、1991年のキジハタ病魚(徳島株)を用いた。感染魚から、核酸抽出液としてアイソジェン(ニッポンジーン)を用い附属のプロトコールに従い核酸(RNA)を抽出し、ウイルスRNAとして以下の実験に供した。

【0019】2) 外被タンパク質遺伝子クローニング

a) RNA 3'末端のポリ(A)鎖付加

ウイルスRNAをポリ(A)ポリメラーゼ(宝酒造)とメーカーが推奨する反応条件下で37℃、4時間反応させた後、フェノール/クロロホルム抽出、Bio-spinカラム(Bio-Rad)によるゲルろ過およびエタノール沈殿を行い適当な濃度になるように2次蒸留水(DDW)に溶解した。

【0020】b) クローニングベクター

クローニングには、pBluescripts SK-(あるいはKS-) (Stratagene)ベクターを用いクローニングに用いた。プラスミドはクローニングに用いる制限酵素EcoRIの付属反应用緩衝液中で希釈し、EcoRIの存在下で37℃、3時間から一晩制限酵素処理した。さらに環状化あるいはプラスミド同士の結合を避けるため、この反応液中に牛小腸由来アルカリホスファターゼ(宝酒造)を加え、50℃、30分間反応させ脱リン酸化し、フェノール/クロロホルム抽出、およびガラスビーズ法(Geneclean kit; BIO 101 Inc.)でプラスミドを回収しTE緩衝液に溶解した。

【0021】c) cDNAの合成とクローニング

cDNAの合成とクローニングは、TimeSaverTM cDNA Synthesis kit (Pharmacia)を用い付属のプロトコールに従い行った。クローニングベクターは、あらかじめEcoRIで処理しアルカリホスファターゼで脱リン酸化したpBluescripts SK-(あるいはKS-)ベクターを用いcDNA断片と組換え体を作製し大腸菌の形質転換に用いた。大腸菌の形質転換の方法は、Hanahanの方法(Hanahan, D. (1983): Studies on transformation of Escherichia coli with plasmids, J. Mol. Biol., 166, 557-580)により行った。

【0022】d) 組換えcDNAクローンのスクリーニング
組換え大腸菌クローンを、アンピシリン耐性遺伝子獲得の有無、lacZ領域内のDNA挿入の有無およびプラスミドDNAの制限酵素処理でスクリーニングした。最終的にはスクリーニングで得られた挿入cDNA断片を標識しブローブとしてノーザンブロット法により外被タンパク質遺伝子

(RNA2)との相補性の確認を行うか、一旦RNA2のcDNAクローンが得られてからはこれを標識し、プローブとしてサザンブロット法でクローンの相補性の確認を行った。

【0023】3) 外被タンパク質遺伝子cDNAクローンの塩基配列の決定

RNA2のcDNAクローンの塩基配列決定のために、その全長が長いものに関してはデリベーションクローンを作製するか、あるいは適当な制限酵素を用いサブクローニングを行った。シーケンシングプライマーは、プラスミドのクローニングサイトの両端にあるユニバーサルシーケンシングプライマーを用いた。塩基配列決定法は、蛍光標識プライマーを用いた標識法およびTaq DNAポリメラーゼによる方法で、ジデオキシ法により行った。すなわち、PEG沈澱で回収したプラスミドクローンを鋳型にし、Dye primer thermal cycle sequence kit (ABI) およびT3/T7 dye primer (ABI) を用いて常法に従いシーケンシング反応を行った。反応産物の電気泳動および塩基配列の

解読は自動シーケンサー (373A DNA シーケンサー; *

外被タンパク質遺伝子ORFクローニング用プライマー

プライマー名	プライマーの配列	RGNNVRNA2上での塩基番号
NNV-F5	5'- <u>gac</u> tcATGGTACGCAAAGGTGA-3'	17-33
NNV-R3	5'- <u>cagc</u> tcgaGGCCATTAAACCACATG-3'	1387-1403

下線部は、NcoI認識配列 (NNV-F5) およびXhoI認識配列 (NNV-R3) を付加するために設けた配列を示す。

【0026】実施例2

1. 組み換え外被タンパク質の作製

1) ウイルス株

ウイルス株は、クエのウイルス株として、1997年長崎株、1998年大分a株、1998年大分b株を、マハタのウイルス株として1997年三重株を用いた。なお何れの株についても予めPCR-RFLP法によりRGタイプであることを確認した。

【0027】2) 全長の外被タンパク質遺伝子cDNAのクローニングと組換え体大腸菌の作製

a) 外被タンパク質遺伝子cDNAの合成

外被タンパク質遺伝子cDNAは、前述の2種類のPCRプライマーを用い、PCRによりRNA2からオープンリーディングフレームを含む領域を増幅したものを用いた。即ち、ウイルス核酸試料を90℃で5分間加熱後氷中で急冷し、10μLの反応液中で42℃、30分間逆転写反応を行った後、99℃で10分間加熱した。この反応液に対し4倍容のPCR溶液を加え、サーマルサイクラーGeneAmp PCR system9600 (PE Applied Bio systems) を用いて、95℃・2分間反応後、95℃・40秒間、55℃・40秒間および72℃・40秒間の一連の反応を30サイクル行った後、72℃・5分間反応させPCR反応を行った。この際、プライマー濃度は0.2μmol/Lに設定し、逆転写酵素にはSuperScript II RT (GIBCO BRL) を40U、RNase阻害剤にはRNase Inhibiter (宝

* ABI) を用いた。

【0024】4) 塩基配列データの解析とプライマー部位の設定

以上の方法で決定した塩基配列は、Genetyx (SDCソフトウェア開発) で配列の結合、翻訳領域の推定等の解析を行ったのち、外被タンパク質遺伝子の両端に位置し、PCRプライマーとして適当な配列を検索した。その結果、上流プライマーとしたプライマーNNV-F5 (配列番号3) は、RNA2の塩基番号17-33に一致する17塩基とNcoI認識配列を付加するために設けた5'末端側の5'-GACTCC-3'配列を合わせた23塩基を設定した。下流プライマーとしたプライマーNNV-R3 (配列番号4) は、RNA2の塩基番号1387-1403に相補的な17塩基とXhoI認識配列を付加するために設けた5'末端側の5'-CAGCTCGA-3'配列を合わせた25塩基を設定した (表1及び図1)。

【0025】

【表1】

酒造) を12.7U、PCR反応にはEXTaq DNAポリメラーゼ

(宝酒造) を2.5Uを反応系に加えた。なお反応は各酵素付属の緩衝液中で行った。PCRにより得られた増幅産物は、フェノール/クロロホルム抽出およびエタノール沈澱により濃縮、1%アガロース (TAE緩衝液) ゲル電気泳動後NaIとガラスビーズを用いた方法で目的のDNA断片を回収した。回収したDNA断片を、NcoIおよびXhoIで切断後、フェノール/クロロホルム抽出およびガラスビーズ法で回収し、TE緩衝液に溶解してcDNA溶液とした。発現用ベクターはpET-16b (Novagen) を用い、プロモーターの下流の翻訳開始コドンが位置するNcoI認識部位をクローニング使用した。pET-16bベクターDNAはNcoIおよびXhoIで切断後、CIAP (宝酒造) で50℃・30分間脱リン酸化処理し、フェノール/クロロホルム抽出およびガラスビーズ法で回収し、TE緩衝液に溶解した。ライゲーションは、ライゲーションキット (宝酒造) のプロトコルに従い、ベクターDNA溶液、cDNA溶液、ライゲーションA液およびライゲーションB液を混合し、16℃で1晩反応させ行った。組換えプラスミドは、まず大腸菌DH5αコンピテント細胞に導入してクローニングし、次にプラスミドクローンを大腸菌DH5αと同様の方法で調製した発現用の大腸菌BL21(DE3)のコンピテント細胞に導入した。形質転換菌はLMA寒天培地で培養後、ディスラブション法によるDNA断片挿入の有無の確認をするとともに、スモ

ールスケール法でプラスミドDNAを回収後、制限酵素処理で解析しスクリーニングを行った（図1、配列番号1及び配列番号2）。

【0028】b) 電気泳動およびウェスタンブロット法による外被タンパク質の発現確認

得られた組換え体大腸菌は、LMA寒天培地で1晩培養後、その単一コロニーを50ng/mLのアンピシリンを含むLB培地に接種し、37℃で対数増殖期前期（OD₆₀₀=0.6）まで培養後、終濃度1mMになるようにイヒプロビル-β-D-チオガラクトシド（IPTG）を加え、さらに3時間培養し組換えタンパク質の発現誘導を行った。発現の誘導を行った菌体を遠心回収し、TE緩衝液に懸濁後1/3容の4×クラッキングバッファーを混合した後、3分間煮沸し泳動サンプルとした。電気泳動には12.5%ポリアクリルアミドゲルを用い、解析には抗SJNNVウサギ血清を用い、その検出にはアルカリフォスファターゼ標識ブタ抗体（DAKO）と発色液にアルカリフォスファターゼ発色用緩衝液にX-リン酸溶液、NBT溶液を添加したものをを用いた。

【0029】電気泳動の結果、供試した4株のRGタイプウイルスすべての株で、ウイルス外被タンパク質と同じ大きさのタンパク質が発現が確認され（図2）、またこの組換えタンパク質はウェスタンブロットの結果、抗SJNNVウサギ抗体（Gyobyo Kenkyu, 27(4), 191-195）と反応した（図3）ことから発現したウイルス外被タンパク質であることが再確認された。作製した組換え大腸菌は、クエ病魚のうち1997年長崎株から作製したものをKG-05、1998年大分a株から作製したものをKG-04、1998大分b株から作製したものをKG-20とし、マハタ病魚の1995年三重株から作製したものをSG-05とした。

【0030】3) 免疫抗原の調製

作製した組換え体大腸菌を用い、上記と同様の操作で発現誘導をおこなった後、遠心回収した菌体を溶菌用緩衝液（50mM TrisHCl pH8.0, 2mM EDTA, 0.1% TritonX-100）に懸濁した。得られた菌体を超音波処理により完全に破壊した。発現した組み換え外被タンパク質は大腸菌中で高度凝集物である封入体として不溶性画分に現れることから、遠心分離（12,000×g・15分間）により3回遠心洗浄して得られた沈殿を組み換え外被タンパク質の精製品とした。

【0031】実施例3

1. マハタを用いた組み換え外被タンパク質によるワク

チン試験

1) 供試魚

マハタ（試験1では平均全長11.4cm, 平均体重28.1g, 試験2では平均全長11.8cm, 平均体重26.7g）を各試験区につき20尾ずつ供試した。

【0032】2) 免疫抗原の調製および免疫スケジュール

免疫抗原には、前述の組換え大腸菌SG-04から調製した組み換え外被タンパク質を用いた。初回の接種は、組み換え外被タンパク質の精製品をPBSで250μg/mLに希釈したものを、1尾当りに200μLずつ筋肉内接種した。対照区には発現用の大腸菌BL21(DE3)を同様に処理し回収した不溶性画分をPBSで15μg/mLに希釈したものを、1尾当りに200μLずつ筋肉内接種した。二回目の接種も同様に行った。免疫スケジュールは、初回の接種から10日後に2回目の接種を行った。効果判定のためのウイルス攻撃試験は、初回の接種から20日後に行った。

【0033】3) ウイルス攻撃試験

a) 攻撃用ウイルス

攻撃用ウイルスにはマハタ病魚（1995年、三重株）の磨砕濾液を用いた。まず、病魚の頭部に等量のPBSを加え磨砕後、1/4容のクロロホルムを添加し混合した。これを遠心分離（8,000×g・30分間）し上清を回収後、0.45μmのフィルターで濾過し、1/2倍希釈ウイルス液として使用まで冷蔵保存（-80℃）した。

【0034】b) 攻撃と観察

攻撃試験は、試験1では10⁻¹、10⁻²、10⁻³倍希釈ウイルス液攻撃区の3区を設け、試験2では10⁻²、10⁻³倍希釈ウイルス液攻撃区の2区を設け、それぞれの希釈段階のウイルス液を1尾当たり200μL筋肉内注射した。攻撃から14日間、死亡個体数を観察した。

【0035】4) ウイルス攻撃による有効性の確認

発現させたウイルス外被タンパク質を接種し攻撃試験を行った結果、2回の試験の死亡率はワクチン区で10～65%、対照区で65～100%となり、いずれの濃度のウイルス液接種群でもワクチン区の死亡率は対照区より有意に低かった（p<0.01）。特に最低濃度のウイルス液接種群では、有効率（RPS）が88%および69%と高いワクチン効果が得られた（図4、表2）。

【0036】

【表2】

マハタワクチン魚のウイルス攻撃試験結果

	試験区	攻撃ウイルスの濃度	死亡率 (%)	χ^2 検定	有効率(RPS)
試験 1	ワクチン接種	10^{-1}	65.0	$p<0.01$	35.0
		10^{-2}	65.0	$p<0.01$	35.0
		10^{-3}	10.0	$p<0.001$	88.2
	対照	10^{-1}	100		
		10^{-2}	100		
		10^{-3}	85.0		
試験 2	ワクチン接種	10^{-2}	60.0	$p<0.01$	36.8
		10^{-3}	20.0	$p<0.01$	69.2
	対照	10^{-2}	95.0		
		10^{-3}	65.0		

【0037】

【発明の効果】本発明によれば、魚類に病原性を有する
ウイルス性神経壊死症原因ウイルスの4つの異なる遺伝
子型のウイルスうち、RGタイプについての組換え外被タ*

20*タンパク質が得られた。さらに、本タンパク質はハタ類に
感染するRGタイプのウイルスに対する感染防止用ワクチ
ンとして有用である。

【0038】

【配列表】 SEQUENCE LISTING

<110> 水産庁長官 (Director-General of Fisheries Agency)

<120> Recombinant coat proteins of nervous necrosis viruses infecting gr
ouper

30

<130> P01381203

<160> 4

<210> 1

<211> 1403

<212> DNA

<213> redspotted grouper nervous necrosis virus RGtype

<400> 1

```

cgctttgcaa tcacaaatgg tacgcaaaag tgagaagaaa ttgqcaaac ccgcqaccac 60
caagqccgcg aatccgcaac cccgcccgcg tgctaacaat cgtcgcgcga gtaatcgac 120
tgacgcacct gtacgtaagg cctcgactgt nactggattt ggacgtggga ccaatgacgt 180
ccatctctca ggtatgtcga gaatctccca ggccgtntct ccaqccggga caqgaacaga 240
cggatacgtt gttgttgacg caaccatcgt ccccgacctc ctgccacgac tggqacacgc 300
tgctagaatc ttccagcgat acgctgttga aacactggag ttgaaattc agccaatgtg 360
ccccqcaaac acgggcgggt gttacgttgc tggttctctg cctgatccaa ctgacaacgt 420
tcacaccttc gacgngcttc aagcaactcg tgggtgcagtc gttgccaaat ggtgggaaa 480
cagaacaqtc cgacctcagt acaaccgcac gctcctctgq acctcgtcgg gaaaaggagca 540
gcgtctcagc tcacctgtgc ggtgtgatac cctgtgtgtt gqcaacaaca gngatgtggt 600
caacgtgtca gtcattgtgc gctggaggtg tcgattaagc gttccatctc ttgagacacc 660
tgaagagacc accgctccca tcattgacac aggttccctg tacaacgatt ccctttccac 720
aatgacttc aagtcacatc tcctaggatc cacaccactg gacattgcc cctgatggagc 780

```


11

12

agtcttccag ctggaccgtc cgctgtccat tgactacagc cttggaactg gagatgttga 840
 ccgtgctgtt tattggcaca tcaagaagtt tgctggaat gctggcacac ctgcaggctg 900
 gtttcgctgg ggcattctgg acaacttcaa caagacgttc acagatggcg ttgcctacta 960
 ctctgatgag cagcctcgtc aaatcctgct gcctgttggc actgtcttca cccgtgttga 1020
 ctccgaaaaa ctaaaccggg tcatncggtt ccctaantnc gtatcgttga tgaccaattt 1080
 tgaacaattg attaaagcac taacaatta taaataaaga aatacaaaaca aacaaaactg 1140
 aaattggaag gaatagaagc gaaattgaat cactcgctag caaattaaac gacaaagcac 1200
 ccaaggaggg tgcgattgct attgttgga cccttgacgg cgtaccgcta cgcttgaagg 1260
 cctatacacg gctggaagcc gccgcgtgct taattgggtg ccagtggtag nagtcgtatc 1320
 caacgccgag gaagtccctc ttgggctgtg tgggttaccg ttactccgcg caatgagcac 1380
 caccgccatg tgggttaaatg gcc 1403

[0039]

<210> 2

<211> 366

<212> PRT

<213> redspotted grouper nervous necrosis virus

<400> 2

Met Val Arg Lys Gly Glu Lys Lys Leu Ala Lys Pro Ala Thr Thr Lys
 5 10 15
 Ala Ala Asn Pro Gln Pro Arg Arg Arg Ala Asn Asn Arg Arg Arg Ser
 20 25 30
 Asn Arg Thr Asp Ala Pro Val Ala Lys Ala Ser Thr Xaa Thr Gly Phe
 35 40 45
 Gly Arg Gly Thr Asn Asp Val His Leu Ser Gly Met Ser Arg Ile Ser
 50 55 60
 Gln Ala Xaa Leu Pro Ala Gly Thr Gly Thr Asp Gly Tyr Val Val Val
 65 70 75 80
 Asp Ala Thr Ile Val Pro Asp Leu Leu Pro Arg Leu Gly His Ala Ala
 85 90 95
 Arg Ile Phe Gln Arg Tyr Ala Val Glu Thr Leu Glu Phe Glu Ile Gln
 100 105 110
 Pro Met Cys Pro Ala Asn Thr Gly Gly Gly Tyr Val Ala Gly Phe Leu
 115 120 125
 Pro Asp Pro Thr Asp Asn Val His Thr Phe Asp Xaa Leu Gln Ala Thr
 130 135 140
 Arg Gly Ala Val Val Ala Lys Trp Trp Glu Ser Arg Thr Val Arg Pro
 145 150 155 160
 Gln Tyr Asn Arg Thr Leu Leu Trp Thr Ser Ser Gly Lys Glu Gln Arg
 165 170 175
 Leu Thr Ser Pro Gly Arg Xaa Ile Leu Leu Cys Val Gly Asn Asn Xaa
 180 185 190
 Asp Val Val Asn Val Ser Val Met Cys Arg Trp Ser Val Arg Leu Ser
 195 200 205
 Val Pro Ser Leu Glu Thr Pro Glu Glu Thr Thr Ala Pro Ile Met Thr
 210 215 220
 Gln Gly Ser Leu Tyr Asn Asp Ser Leu Ser Thr Asn Asp Phe Lys Ser
 225 230 235 240
 Ile Leu Leu Gly Ser Thr Pro Leu Asp Ile Ala Pro Asp Gly Ala Val
 245 250 255
 Phe Gln Leu Asp Arg Pro Leu Ser Ile Asp Tyr Ser Leu Gly Thr Gly

13

14

260 265 270
 Asp Val Asp Arg Ala Val Tyr Trp His Ile Lys Lys Phe Ala Gly Asn
 275 280 285
 Ala Gly Thr Pro Ala Gly Trp Phe Arg Trp Gly Ile Trp Asp Asn Phe
 290 295 300
 Asn Lys Thr Phe Thr Asp Gly Val Ala Tyr Tyr Ser Asp Glu Gln Pro
 305 310 315 320
 Arg Gln Ile Leu Leu Pro Val Gly Thr Val Phe Thr Arg Val Asp Ser
 325 330 335
 Glu Lys Leu Asn Arg Val Xaa Arg Phe Pro Xaa Xaa Val Ser Xaa Met
 340 345 350
 Thr Asn Phe Glu Gln Leu Ile Lys Ala Leu Thr Asn Tyr Lys
 355 360 365

【0040】

<210> 3
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> Artificial sequence
 <220>
 <223> Designed DNA based on RGNNV
 <400> 3
 gactccatgg tacqcaaagg tga 23

【0041】

<210> 4
 <211> 25
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Designed DNA based on RGNNV
 <400> 4
 cagctcgagg ccatttaacc acatg 25

【図面の簡単な説明】

【図1】RGタイプのウイルスの外被タンパク質遺伝子塩基配列上に設計したプライマー結合部位を示す図である。

【図2】大腸菌で発現させた組換えタンパク質の電気泳動による解析像を示す図である〔レーン1：純化SJNNV、レーン2：組換えヒラメNNV外被タンパク質（岩手株）、レーン3：組換えクエNNV外被タンパク質（長崎株）、レーン4：組換えマハタNNV外被タンパク質（三

重株）、レーン5：組換えクエNNV外被タンパク質（大分a株）、レーン6：組換えクエNNV外被タンパク質（大分b株）〕。

【図3】大腸菌で発現させた組換えタンパク質のウエスタンブロットによる解析像を示す図である（各レーンは図2と同じ）

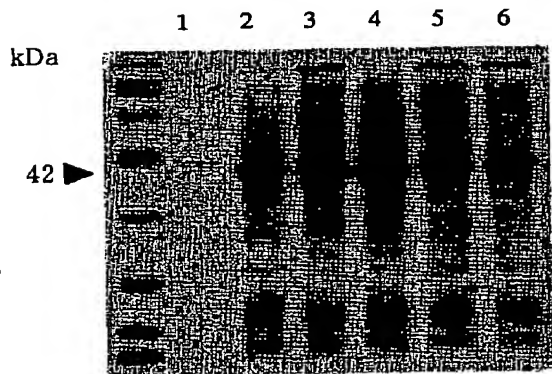
【図4】試験1の 10^{-3} 倍希釈ウイルス液攻撃区のワクチン接種魚と非接種魚のウイルス攻撃試験時の死亡率の推移を示す図である。

【図1】

CGCTTTGCAATCACAATGGTACGCAAAGGTGAGAAGAAATTGGCAAAACCCGCGACCACCAAGGCCGGAATCCGCAAC
 CCCGCCGGCGTGCTAACAATCGTCGGCGTAGTAATCGCACTGACGCACCTGTAGCTAAGGCCTCGACTGTNACTGGATTT
 GGACGTGGGACCAATGACGTCCATCTCTCAGGTATGTCGAGAATCTCCAGGCCGTNCTCCAGCCGGGACAGGAACAGA
 CGGATACGTTGTTGTTGACGCAACCATCGTCCCGACCTCTGCCACGACTGGGACACGCTGCTAGAATCTCCAGCGAT
 ACGCTGTTGAAACACTGGAGTTTGAATTCAGCCAATGTGCCCCGAAACACGGCGGTGGTTACGTTGCTGGCTTCTTG
 CCTGATCCAACTGACAACGTTTACACCTTCGACGNGCTTCAAGCAACTCGTGGTGCACTCGTTGCCAAATGGTGGGAAAG
 CAGAACAGTCCGACCTCAGTACAACCGCACGCTCTCTGGACCTCGTGGGAAAGGAGCAGCGTCTCACGTCACCTGGTC
 GGNTGATACTCCTGTGTGTTGGCAACAACAGNATGTGGTCAACGTGTCACTCATGTGTCTGCTGGAGTGTTCGATTAAAGC
 GTTCATCTCTTGAGACACTGAAGAGACCACCGCTCCCATCATGACACAAGGTTCCCTGTACAACGATTCCCTTCCAC
 AAATGACTTCAAGTCCATCCTCTAGGATCCACACCACTGGACATTGCCCTGATGGAGCAGTCTTCAGCTGGACCGTC
 CGCTGTCCATTGACTACAGCCTTGGAACTGGAGATGTTGACCGTGCTGTTATTGGCACATCAAGAAGTTTGCTGGAAAT
 GCTGGCACACCTGCAGGCTGGTTTCGCTGGGGCATCTGGGACAACCTCAACAAGACGTTACAGATGGCGTTGCCTAGTA
 CTCTGATGAGCAGCCTCGTCAAATCCTGCTGCTGTTGGCACTGTCTTCAACCGTGTGACTCGGAAAACTAAACCGGG
 TCATNCGGTTCCCTAANTNCGTATCAGTATGACCAATTTGAACAATTGATTAAAGCACTAACAATTATAAATAAAGA
 AATACAAACAAACAAACTGAAATTGGAAAGAATAGAAGCGAAATTGAATCACTCGCTAGCAAATTAACGACAAAGCAC
 CCAAGGAGGGTGCGATTGCTATTGTTGGTACCCTTGACGGCGTACCCTACGCTTGAAGGCTATACACGGCTGGAAGCC
 GCCGCGTGCTTAATTGGGTGCCAGTGGTACNAGTGTATCCAACGCCGAGGAAGTCCCTCTTTGGGCTGTTGGGTTACCG
 TTACTCCGCGCAATGAGCACACCGCCATGTGGTTAAATGGCC

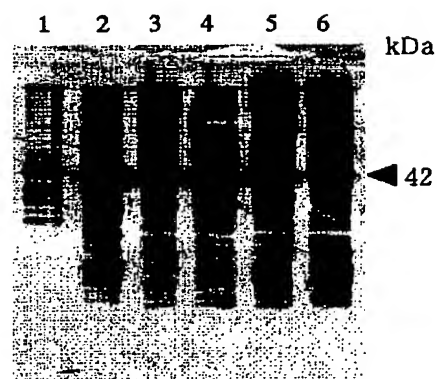
下線部 () が設定したプライマー結合部位

【図2】



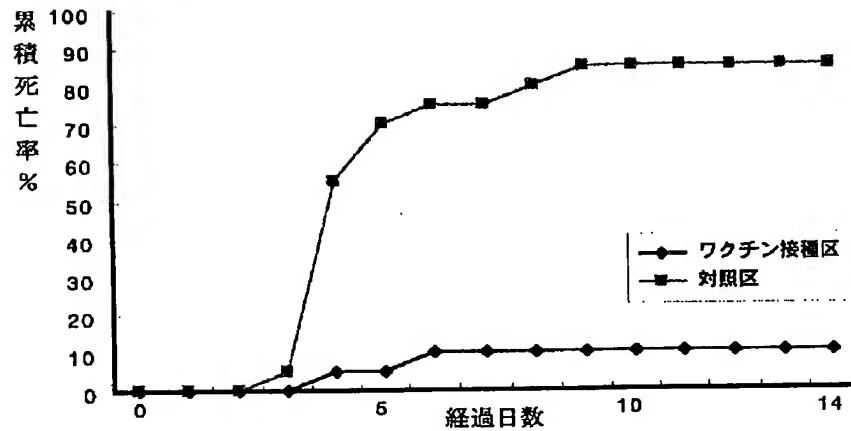
12% SDS-ポリアクリルアミド電気泳動

【図3】



ウェスタンブロット

【図4】



フロントページの続き

(51)Int.Cl.	識別記号	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 15/09	Z N A	C 1 2 P 21/02	C 4 H 0 4 5
C 1 2 P 21/02		C 1 2 N 15/00	Z N A A

F ターム (参考) 2B104 AA01 BA14
 4B024 AA10 BA32 CA04 EA04 GA11
 4B064 AG31 CA02 CA19 CC24 DA04
 4B065 AA26X AA95Y AB01 AC14
 BA02 CA24 CA43
 4C085 AA03 BA51 CC07 DD23 DD43
 EE01 GG01
 4H045 AA10 AA11 BA10 CA01 DA86
 EA31 FA72 FA74